

Induksi dan Proliferasi Embriogenesis Somatik *In Vitro* pada Lima Genotipe Kedelai***Induction and Proliferation of In Vitro Somatic Embryogenesis on Five Soybean Genotypes*****Adam Saepudin^{1,2}, Nurul Khumaida^{3*}, Didy Sopandie³, dan Sintho Wahyuning Ardie³**¹Program Studi Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor²Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Siliwangi

Jl. Siliwangi No. 24 Tasikmalaya 46115, Indonesia

³Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor
(Bogor Agricultural University), Jl. Meranti, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680, Indonesia

Diterima 22 Agustus 2014/Disetujui 20 Agustus 2015

ABSTRACT

Somatic embryo induction medium was reported to be genotype dependent for soybean. This study was aimed to obtain the optimum medium for embryo somatic induction and proliferation, and to regenerate somatic embryo of five soybean genotypes. Five soybean genotypes (Tanggamus, Anjasmoro, Yellow Biloxi, CG-22-10, and SP-10-4) were used in this study. The research was divided into four steps: (1) embryogenic callus induction of five soybean genotypes, (2) embryogenic callus proliferation of five soybean genotypes, (3) optimization of embryo somatic induction on five soybean genotypes and (4) embryo somatic regeneration of five soybean genotypes. The induction experiment showed that based on number of embryogenic callus, the best somatic embryo-induction medium was 3% sucrose + NAA 5 mg L⁻¹ + 2,4-D 5 mg L⁻¹ + Vitamin B5. Embryogenic callus number for each genotype tested was increased on proliferation media of 3% sukrosa + 2,4-D 5 mg L⁻¹ + NAA 5 mg L⁻¹ + Vit B5, and Yellow Biloxi gave the highest number of proliferated somatic embryos compared to other genotypes. Increasing number of globular somatic embryo of all genotypes was obtained from the optimization of somatic embryo induction media being used, and Tanggamus genotype gave the highest number of globular somatic embryo which followed by Yellow Biloxi genotype. Tanggamus and Yellow Biloxi genotypes were also successfully formed the four steps of somatic embryos (globular, heart, torpedo, and cotyledonary stages), but in regeneration medium of MS0 and media MS + sukrosa 10 g L⁻¹ + GA3 2 mg L⁻¹ + BAP 4 mg L⁻¹ + Vit B5 only Tanggamus genotype was regenerated into plantlet.

Keywords: 2,4-D, NAA, somatic embryos, induction, proliferation

ABSTRAK

Media untuk induksi embrio somatik pada kedelai dilaporkan sangat dipengaruhi oleh genotipe tanaman (genotype dependent). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memperoleh media yang optimum untuk induksi dan proliferasi embriogenesis somatik, dan meregenerasikannya pada lima genotipe kedelai. Genotipe kedelai yang digunakan adalah Tanggamus, Anjasmoro, Yellow Biloxi, CG-22-10, dan SP-10-4. Penelitian ini terbagi atas empat tahapan: (1) Induksi kalus embriogenik (KE) lima genotipe kedelai, (2) Proliferasi KE lima genotipe kedelai, (3) Optimasi induksi ES lima genotipe kedelai, dan (4) Regenerasi ES lima genotipe kedelai. Hasil percobaan induksi KE menunjukkan berdasarkan jumlah kalus embriogenik yang dihasilkan, media induksi terbaik adalah 3% sukrosa + 2,4-D 5 mg L⁻¹ + NAA 5 mg L⁻¹ + Vitamin B5. Jumlah KE untuk masing-masing genotipe meningkat pada media proliferasi 3% sukrosa + 2,4-D 5 mg L⁻¹ + NAA 5 mg L⁻¹ + Vit B5 dan genotipe Yellow Biloxi memberikan jumlah ES hasil proliferasi tertinggi dibanding genotipe lainnya. Peningkatan jumlah embrio globular diperoleh pada media optimasi induksi ES pada semua genotipe yang diuji, dan genotipe Tanggamus menghasilkan jumlah embrio globular tertinggi diikuti oleh genotipe Yellow Biloxi. Genotipe Tanggamus dan Yellow Biloxi juga mampu menghasilkan keempat bentuk tahapan embrio somatik (globular, hati, torpedo, dan kotiledon), namun pada media regenerasi MS0 dan media MS + sukrosa 10 g L⁻¹ + GA3 2 mg L⁻¹ + BAP 4 mg L⁻¹ + Vit B5 hanya genotipe Tanggamus yang berhasil beregenerasi membentuk plantlet.

Kata kunci: 2,4-D, NAA, embrio somatik, induction, proliferation

* Penulis untuk korespondensi. e-mail: nkhumaida@yahoo.com

PENDAHULUAN

Kedelai (*Glycine max* L. Merrill) merupakan tanaman pangan penting setelah padi, khususnya di Indonesia dan digunakan sebagai pangan maupun bahan pakan ternak (Suharsono dan Jusuf, 2009). Kedelai dikenal juga sebagai bahan pangan yang mengandung gizi tinggi terutama kandungan protein biji dan kandungan minyak nabatinya (Ugandhar *et al.*, 2011).

Produksi nasional kedelai masih belum mencukupi kebutuhan, sehingga setiap tahun Indonesia mengimpor kedelai. Rata-rata kebutuhan kedelai per tahun sebesar 2.1 juta ton, sementara produksi total dalam negeri baru mencapai 900 ribu ton, karena itu masih diperlukan impor sebesar 1.2 juta ton. Produksi kedelai juga mengalami penurunan, tercatat produksi pada tahun 2013 sebesar 807.5 ribu ton menurun sebesar 35.6 ribu ton dibandingkan dengan produksi tahun 2012 (BPS, 2014). Upaya untuk meningkatkan produksi diperlukan agar impor dapat ditekan dan swasembada kedelai dapat tercapai.

Upaya-upaya yang dapat dilakukan untuk peningkatan produksi kedelai adalah dengan perluasan areal tanam, perbaikan varietas, dan perbaikan teknologi budidaya. Program perluasan areal tanam (ekstensifikasi) antara lain dapat dilakukan pada lahan-lahan suboptimal.

Pengembangan kedelai di lahan suboptimal khususnya pada tanah masam dan bersifat kering atau yang mengalami kekeringan (*drought*) memerlukan varietas unggul, yaitu varietas yang mempunyai ketahanan terhadap cekaman kekeringan dan atau tanah masam. Varietas unggul ini dapat dirakit melalui perbaikan genetik baik persilangan konvensional maupun melalui pendekatan bioteknologi tanaman.

Keragaman genetik yang tinggi pada kedelai (*Glycine max* (L.) Merr.) sangat penting untuk program pemuliaan tanaman. Keragaman genetik tersebut antara lain dapat diperoleh melalui variasi somaklonal [variasi somaklonal adalah variasi yang terjadi dalam populasi tanaman hasil kultur jaringan (Lestari, 2006; Orbovic *et al.*, 2008)]. Variasi somaklonal yang didapatkan dari kultur *in vitro* dapat digunakan sebagai sumber keragaman genetik baru yang diperlukan dalam program pemuliaan untuk perbaikan sifat tanaman atau menghasilkan kultivar baru.

Salah satu strategi yang dapat digunakan untuk memperoleh variasi somaklonal yang melibatkan perubahan genetik tanaman adalah melalui seleksi *in vitro*. Embriogenesis somatik merupakan salah satu teknik kultur *in vitro* yang memberikan peluang tinggi untuk mendapatkan tanaman yang berasal dari satu sel, sehingga seleksi *in vitro* dapat dilakukan pada tingkat sel atau jaringan. Variasi somaklonal dalam kultur *in vitro* dipengaruhi oleh pemilihan jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh dalam media (Bairu *et al.*, 2011). Penelitian embriogenesis kedelai sebelumnya melaporkan bahwa penggunaan ZPT 2,4-D pada konsentrasi yang tinggi dapat menyebabkan variasi somaklonal (Mohanty *et al.*, 2008). Variasi somaklonal yang diperoleh melalui kultur *in vitro* dapat digunakan

sebagai materi seleksi *in vitro* dengan menggunakan media seleksi yang sesuai, sehingga diperoleh somaklon dengan sifat yang diinginkan. Tersedianya protokol embriogenesis somatik merupakan salah satu syarat untuk melakukan seleksi *in vitro*. Induksi embriogenesis somatik dapat terjadi secara langsung (tanpa dediferensiasi sel dan jaringan untuk membentuk kalus) dan secara tidak langsung atau dengan melalui fase pembentukan kalus (Ducos *et al.*, 2007; Hussein *et al.*, 2006). Embriogenesis somatik pada kedelai sangat dipengaruhi oleh genotipe tanaman (*genotype dependent*). Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh media induksi kalus embriogenik, proliferasi kalus embriogenik, optimasi induksi embrio somatik dan regenerasi embrio somatik pada lima genotipe kedelai.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan dan Laboratorium Mikroteknik, Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, IPB. Analisis histologi jaringan dilakukan di Laboratorium Histologi, Fakultas Kedokteran Hewan, IPB. Penelitian dilaksanakan mulai bulan Januari 2011 sampai dengan Maret 2014. Penelitian ini terdiri atas dua tahapan percobaan, yaitu: (1) induksi kalus embriogenik (KE) lima genotipe kedelai, (2) proliferasi KE lima genotipe kedelai, (3) optimasi induksi embrio somatik (ES) lima genotipe kedelai, dan (4) regenerasi ES lima genotipe kedelai.

Induksi Kalus Embriogenik (KE) Lima Genotipe Kedelai

Percobaan induksi ini disusun berdasarkan rancangan acak lengkap (RAL) dengan dua faktor. Faktor pertama adalah genotipe kedelai yang meliputi 5 genotipe yaitu : Tanggamus, Anjasmoro, Yellow biloxi, CG-22-10, dan SP-10-4. Faktor kedua adalah komposisi media induksi kalus embriogenik yang terdiri atas 10 taraf kombinasi sukrosa dan ZPT dengan media dasar MS + 2 g L⁻¹ gelrite + vit B5 (Tabel 1). Percobaan ini dilaksanakan dalam tiga ulangan dengan satu botol kultur berisi empat kotiledon muda sebagai satuan percobaan.

Sumber eksplan berupa kotiledon muda yang berasal dari polong muda berumur 14 hari setelah bunga mekar dengan ukuran 4-6 mm (Yang, 2009). Eksplan kemudian disterilisasi dengan alkohol 70% selama 3 menit lalu dibilas 3 kali menggunakan akuades steril. Sterilisasi dilanjutkan dengan pengocokan dalam larutan natrium hipoklorit (NaOCl) 1.3% selama 15 menit, dan dibilas dengan aquades steril 3 kali. Kotiledon muda tanpa aksis embrio ditanam dengan posisi abaksial, yaitu bagian kotiledon yang cembung menyentuh media tanam. pH media pada tiap perlakuan diatur pada skala 5.6-5.8. Kultur dipelihara di ruang kultur dengan suhu 24 ± 3 °C, tingkat penyiaran 1500 lux dan fotoperiode 24 jam. Pengamatan dilakukan pada 5 minggu setelah kultur (MSK) pada jumlah *clump* KE dan jumlah setiap bentuk embrio somatik (fase globular, hati, torpedo, dan kotiledon) pada 12 minggu setelah kultur (MSK).

Proliferasi KE Lima Genotipe Kedelai

Percobaan ini menggunakan sumber eksplan yang berasal dari KE kedelai hasil percobaan sebelumnya. Percobaan ini disusun berdasarkan RAL dengan dua faktor. Faktor pertama komposisi media asal induksi yang terdiri atas 6 taraf, yaitu media MS + 2 g L⁻¹ gelrite + 30 g L⁻¹ sukrosa + Vit B5 dengan penambahan ZPT atau kombinasinya dengan asam amino (I4, I5, I6, I7, I8, dan I10) (Tabel 1). Faktor kedua adalah komposisi media proliferasi ES yang terdiri atas 5 taraf yaitu media MS + 2 g L⁻¹ gelrite + 30 g L⁻¹ sukrosa + Vit B5 dengan penambahan ZPT atau kombinasinya dengan asam amino (I4, I5, I6, I8, dan I10) (Tabel 1). Media proliferasi ini merupakan lima media induksi terbaik pada percobaan sebelumnya. Percobaan disusun dalam 7 ulangan dengan satu botol kultur berisi empat kulum kalus sebagai satuan percobaan. pH media pada tiap perlakuan diatur pada skala 5,6-5,8. Kultur dipelihara di ruang kultur dengan suhu 24 ± 3° C, tingkat penyiangan 1500 lux dan fotoperiode 24 jam. Pengamatan dilakukan terhadap jumlah kulum KE dan jumlah ES per kulum yang terbentuk pada 5 minggu setelah proliferasi (MSP).

Optimasi Induksi ES Lima Genotipe Kedelai

Tujuan dari percobaan ini adalah untuk mendapatkan komposisi media induksi embrio somatik terbaik berdasarkan hasil dari Percobaan 1 dan 2. Eksplan yang digunakan adalah polong muda (*immature pod*) kedelai yang berumur 14 hari setelah bunga mekar dengan ukuran 4-6 mm. Metode sterilisasi eksplan sama dengan sterilisasi yang dilakukan pada percobaan 1. Percobaan disusun menurut rancangan acak lengkap (RAL) dengan dua faktor. Faktor pertama adalah genotipe kedelai (Tanggamus, Anjasmoro, Yellow biloxi, CG-22-10, dan SP-10-4). Faktor kedua adalah komposisi media induksi ES yang terdiri atas 3 taraf, yaitu media MS + 2 g L⁻¹ gelrite + 30 g L⁻¹ sukrosa + Vit B5 dengan penambahan ZPT (2,4-D 10 mg L⁻¹ + NAA 10 mg L⁻¹; 2,4-D 5 mg L⁻¹ + NAA 5 mg L⁻¹; dan 2,4-D 40 mg L⁻¹). Percobaan ini terdiri atas 10 ulangan dengan satu botol

kultur berisi dua kotiledon sebagai satuan percobaan. pH media pada tiap perlakuan diatur pada skala 5,6-5,8. Kultur diinkubasi di ruang terang dengan suhu 24 ± 3 °C, tingkat penyiangan 1500 lux dan fotoperiode 24 jam. Pengamatan dilakukan pada 6 MSK, yaitu terhadap jumlah ES terbentuk, jumlah ES beregenerasi, dan pengamatan histologi dengan menggunakan metode parafin dengan pewarnaan *alcian blue* (AB) (Khasim, 2002) pada berbagai fase ES.

Regenerasi ES Lima Genotipe Kedelai

Tujuan dari percobaan ini adalah untuk dapat meregenerasikan embriosomatik hasil percobaan sebelumnya (Percobaan 1, 2, dan 3). Percobaan ini menggunakan eksplan embrio somatik hasil percobaan sebelumnya (Percobaan 1, 2 dan 3) yang ditanam pada media regenerasi ES MS0 (*free hormon*) yang kemudian disubkultur ke media media MS + sukrosa 10 g L⁻¹ + GA3 2 mg L⁻¹ + BAP 4 mg L⁻¹ + Vit B5. pH media regenerasi diatur pada skala 5,6-5,8. Kultur dipelihara di ruang terang dengan suhu 24 ± 3 °C, tingkat penyiangan 1500 lux dan fotoperiode 24 jam. Pengamatan dilakukan terhadap perkecambahan ES (globular, hati, torpedo dan kotiledon) dan perkembangannya membentuk inisiasi tunas (*plantlet*).

HASIL DAN PEMBAHASAN*Induksi Kalus Embriogenik (KE) Lima Genotipe Kedelai*

Eksplan kotiledon muda semua genotipe yang diuji mulai membentuk kalus saat umur 4 minggu setelah tanam (MST). Terdapat interaksi antara media induksi dan genotipe terhadap persentase eksplan berkalus pada 5 MST (Tabel 2). Media induksi yang ditambah 3% suk + NAA 5 mg L⁻¹ menghasilkan persentase eksplan berkalus lebih tinggi pada tiap genotipe yang digunakan menunjukkan respon eksplan pada media tersebut lebih tinggi dibanding pada media induksi lainnya. Terbentuknya kalus-kalus pada eksplan menunjukkan adanya eksplan yang responding terhadap pembentukan kalus embriogenik. Setelah 5 MST

Tabel 1. Komposisi media induksi kalus embriogenik

Kode	Komposisi media
I1	6% Sukrosa + 2,4-D 40 mg L ⁻¹ + glycine 2 mg L ⁻¹ + arginine 100 mg L ⁻¹ + glutamine 100 mg L ⁻¹
I2	6% Sukrosa + 2,4-D 20 mg L ⁻¹ + glycine 1 mg L ⁻¹ + arginine 50 mg L ⁻¹ + glutamine 50 mg L ⁻¹
I3	3% Sukrosa + 2,4-D 40 mg L ⁻¹ + glycine 2 mg L ⁻¹ + arginine 100 mg L ⁻¹ + glutamine 100 mg L ⁻¹
I4	3% Sukrosa + 2,4-D 20 mg L ⁻¹ + glycine 1 mg L ⁻¹ + arginine 50 mg L ⁻¹ + glutamine 50 mg L ⁻¹
I5	3% Sukrosa + NAA 5 mg L ⁻¹
I6	3% Sukrosa + NAA 5 mg L ⁻¹ + arginine 100 mg L ⁻¹ + glutamine 100 mg L ⁻¹
I7	3% Sukrosa + 2,4-D 10 mg L ⁻¹ + NAA 10 mg L ⁻¹
I8	3% Sukrosa + 2,4-D 5 mg L ⁻¹ + NAA 5 mg L ⁻¹
I9	3% Sukrosa + 2,4-D 40 mg L ⁻¹
I10	3% Sukrosa + 2,4-D 20 mg L ⁻¹

Keterangan: NAA = naphthalene acetic acid; 2,4-D = 2,4-dichloropbenoxy acetic acid

Tabel 2. Pengaruh media induksi dan genotipe terhadap persentase eksplan berkalus per botol pada 5 MSK

Media induksi	Genotipe				
	Tanggamus	Anjasmoro	Yellow biloxi	CG-22-10	SP-10-4
I1	50.00d	58.33cd	66.67bcd	66.67bcd	66.67bcd
I2	50.00d	91.67ab	83.33abc	66.67bcd	66.67bcd
I3	58.33cd	66.67bcd	75.00a-d	75.00a-d	75.00a-d
I4	83.33abc	66.67bcd	91.67ab	100.00a	100.00a
I5	100.00a	100.00a	100.00a	91.67ab	100.00a
I6	83.33abc	91.67ab	91.67ab	91.67ab	91.67ab
I7	75.00a-d	91.67ab	91.67ab	100.00a	100.00a
I8	91.67ab	83.33abc	91.67ab	91.67ab	91.67ab
I9	83.33abc	75.00a-d	91.67ab	66.67bcd	66.67bcd
I10	100.00a	75.00a-d	75.00a-d	91.67ab	91.67ab

Keterangan: Angka-angka yang diikuti huruf sama pada baris maupun kolom menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT ($\alpha = 0.05$). Seluruh media menggunakan media dasar MS, gelrite 2 g L⁻¹ dan mengandung vitamin B5. Suk = sukrosa; Asam amino1 = glisin 2 mg L⁻¹

mulai terbentuk kalus yang embriogenik yaitu kalus yang memiliki struktur kompak dan ditemukan warna kalus yang putih kekuningan. Kalus yang berwarna putih kekuningan dengan struktur yang kompak mengindikasikan adanya kapasitas embriogenik dari massa kalus tersebut (Kumari *et al.*, 2006). Kalus embriogenik juga dicirikan oleh adanya struktur embrio somatik pada kalus yang dihasilkan (Gambar 1A), sedangkan kalus yang tidak embriogenik tidak membentuk struktur embrio (Gambar 1B).

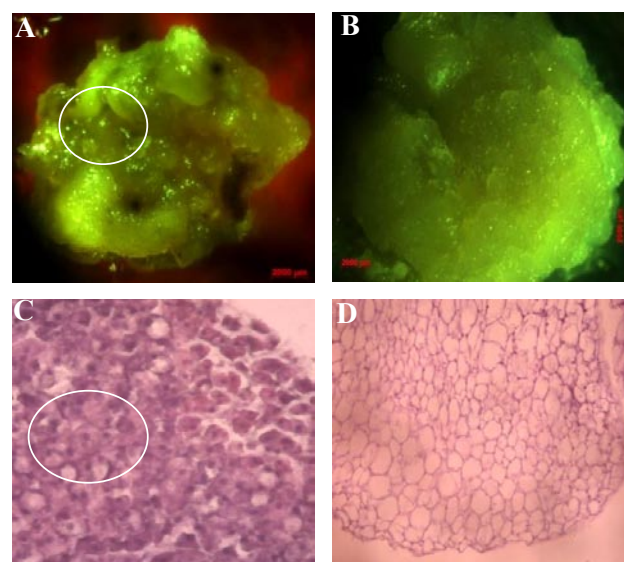
Kalus embriogenik dibuktikan melalui pengamatan histologis, sebagai contoh media MS yang mengandung 2,4-D 10 mg L⁻¹ + NAA 10 mg L⁻¹ menghasilkan struktur *pre-embryogenic mass* (PEM) dengan ciri-ciri berbentuk isodiametris, memiliki nukleus yang besar dan sitoplasma yang pekat (Gambar 1C) yang merupakan ciri sel-sel embriogenik (Jalil *et al.*, 2008). Dengan demikian, kalus yang terbentuk pada media MS yang mengandung 2,4-D 10 mg L⁻¹ + NAA 10 mg L⁻¹ adalah kalus embriogenik. Gambar 1D menunjukkan kalus non embriogenik yang tidak membentuk struktur PEM tersebut.

Induksi kalus embriogenik dipengaruhi oleh genotipe (Texeira *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2009) maupun media induksi yang digunakan (Rossin and Rey 2011; Cangahuala-Inocente *et al.*, 2007). Tabel 3 menunjukkan adanya pengaruh interaksi antara genotipe dan media induksi terhadap jumlah kulum KE yang dihasilkan. Jumlah kulum KE tertinggi (26.3) didapatkan pada genotipe Anjasmoro yang dikulturkan pada media induksi 3% sukrosa + 2,4-D 5 mg L⁻¹ + NAA 5 mg L⁻¹, menunjukkan responsivitas eksplan kotiledon terhadap pembentukan kalus embriogenik berbeda-beda dan dipengaruhi bukan oleh faktor tunggal tetapi oleh adanya interaksi antara genotipe dan media induksi yang digunakan.

Media yang mengandung sukrosa dengan konsentrasi tinggi (6%) dan asam amino (I1 dan I2) menghasilkan jumlah kulum KE yang lebih rendah pada semua genotipe. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa sukrosa dengan

konsentrasi tinggi dan asam amino bukan merupakan faktor induktif untuk pembentukan embrio somatik ataupun jaringan yang embriogenik. Peningkatan konsentrasi sukrosa dan asam amino khususnya glutamin diperlukan pada fase pematangan dan perkembangan embrio (Thiruvengadam *et al.*, 2006; Karami *et al.*, 2006).

Tabel 4 menunjukkan jumlah total ES kelima genotipe kedelai yang dihasilkan pada tahap induksi, yaitu didapatkan hanya pada media induksi 3% sukrosa + 2,4-D 10 mg L⁻¹ +



Gambar 1. Kalus embriogenik dan struktur PEM yang dihasilkan pada genotipe SP-10-4 : A) Kalus non embriogenik pada media induksi 3% sukrosa + 2,4-D 10 mg L⁻¹ + NAA 10 mg L⁻¹ pada 6 MSK, B) Kalus embriogenik pada media induksi 3% sukrosa + 2,4-D 5 mg L⁻¹ + NAA 5 mg L⁻¹ pada 6 MSK, C) Struktur PEM tidak didapatkan pada kalus non embriogenik, dan D) Struktur PEM teramati pada kalus embriogenik yang terinduksi dicirikan dengan sel-selnya yang kecil dan inti besar

Tabel 3. Pengaruh media induksi dan genotipe terhadap jumlah clump kalus embriogenik per botol pada 5 MSK

Media induksi	Genotipe				
	Tanggamus	Anjasmoro	Yellow biloxi	CG-22-10	SP-10-4
I1	0.00m	0.00m	0.00m	0.00m	2.67g-m
I2	0.00m	1.67j-m	0.67lm	2.00i-m	3.67g-m
I3	0.00m	0.67l-m	0.00m	0.00m	8.33c-m
I4	8.33c-m	13.67b-k	20.67ab	6.33d-m	14.33a-i
I5	12.00b-m	14.67a-h	1.00klm	6.33d-m	15.00a-g
I6	10.67b-m	20.00abc	5.00g-m	14.00b-i	18.33a-d
I7	4.33g-m	6.33d-m	6.33d-m	7.00d-m	19.33abc
I8	5.67e-m	26.33a	13.33b-l	15.33a-f	5.00g-m
I9	1.67j-m	13.00b-l	1.00klm	0.67lm	2.33h-m
I10	7.00d-m	9.33b-m	10.00b-m	3.00g-m	18.00a-d

Keterangan: Angka-angka yang diikuti huruf sama pada baris maupun kolom menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT ($\alpha = 0.05$). Seluruh media menggunakan media dasar MS, gelrite 2 g L⁻¹ dan mengandung vitamin B5. Suk = sukrosa; Asam amino1 = glisin 2 mg L⁻¹ + arginin 100 mg L⁻¹ + glutamin 100 mg L⁻¹; Asam amino2 = glisin 1 mg L⁻¹ + arginin 50 mg L⁻¹ + glutamin 50 mg L⁻¹; Asam amino3 = arginin 100 mg L⁻¹ + glutamin 100 mg L⁻¹

NAA 10 mg L⁻¹ (I7) pada 12 MSK. Genotipe Yellow biloxi dapat menghasilkan ES hingga fase kotiledon (terdiri atas 1 bentuk globular, 3 torpedo, dan 3 kotiledon). Genotipe lainnya, yaitu Tanggamus, Anjasmoro, dan CG-22-10 hanya menghasilkan masing-masing 1 embrio fase globular sedangkan SP 10-4 menghasilkan 4 embrio fase globular. Genotipe Anjasmoro meskipun pada media induksi 3% sukrosa + 2,4-D 5 mg L⁻¹ + NAA 5 mg L⁻¹ lebih responsif membentuk KE tetapi tidak dapat membentuk ES pada media tersebut. Gambar 2 menunjukkan berbagai tahapan ES yang dihasilkan kelima genotipe kedelai (Tanggamus, Anjasmoro, Yellow biloxi, CG-22-10, dan SP-10-4) selama tahap induksi ES.

Pembentukan tahap-tahap embrio yang dihasilkan tersebut bergantung pada genotipe kedelai yang digunakan. Loganathan *et al.* (2010) menunjukkan bahwa genotipe sangat berpengaruh dalam keberhasilan embriogenesis somatik. Beberapa genotipe lebih responsif terhadap media kultur dibandingkan genotipe lainnya (Thiruvengadam *et al.*, 2006; Hiraga *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2009). Feitosa *et al.* (2007); Saelim *et al.* (2006); Rossin and Rey (2011)

Tabel 4. Jumlah total ES lima genotipe kedelai pada media induksi I7 (3% sukrosa+ 2,4-D 10 mg L⁻¹ + NAA 10 mg L⁻¹) pada 12 MSK

Genotipe	Jumlah ES terbentuk pada tahap induksi			
	Globular	Hati	Torpedo	Kotiledon
Tanggamus	1	0	0	0
Anjasmoro	1	0	0	0
Yellow biloxi	1	0	3	3
CG-22-10	2	0	0	0
SP-10-4	4	0	0	0

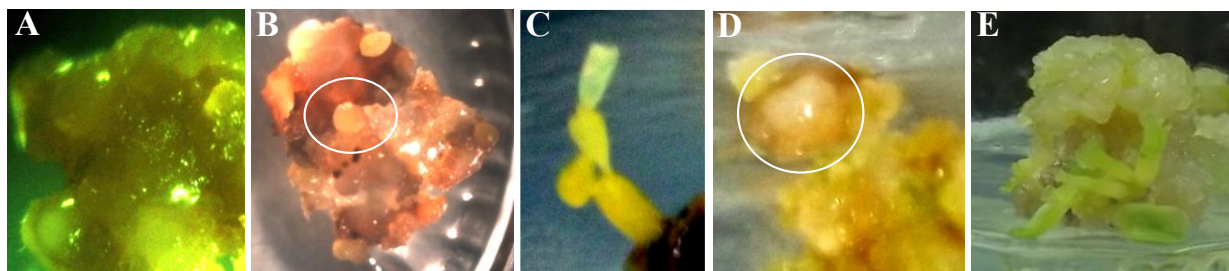
menunjukkan bahwa tingkat diferensiasi embrio somatik yang berlangsung dengan keberadaan auksin dapat berbeda-beda tergantung spesies tanamannya.

Perlakuan zat pengatur tumbuh seperti konsentrasi auksin juga mempengaruhi terbentuknya fase-fase embrio somatik, selain genotipe. Hasil percobaan ini menunjukkan bahwa penambahan NAA 10 mg L⁻¹ yang dikombinasikan dengan 2,4-D 10 mg L⁻¹ mampu menginduksi pembentukan embrio somatik yang kemudian berkembang menjadi ES (torpedo dan kotiledon). NAA merupakan jenis auksin yang diduga berperan dalam proses pembentukan dan pematangan embrio somatik, khususnya mempengaruhi morfologi embrio yang terbentuk (Mongomake *et al.*, 2015).

Proliferasi KE Lima Genotipe Kedelai

Percobaan ini menggunakan eksplan kalus embriogenik hasil percobaan induksi (Percobaan 1), kalus-kalus tersebut mengalami proliferasi diindikasikan dengan peningkatan jumlah kulum kalus embriogenik maupun jumlah embrio globular yang dihasilkan pada setiap genotipe yang diuji, seperti yang terjadi pada genotipe Tanggamus (Gambar 3).

Hasil pengujian Duncan ($\alpha = 0.05$) menunjukkan adanya pengaruh faktor tunggal media proliferasi terhadap jumlah kulum kalus embriogenik yang dihasilkan. Media proliferasi 3% sukrosa + 2,4-D 5 mg L⁻¹ + NAA 5 mg L⁻¹ memberikan jumlah kulum KE tertinggi pada genotipe Anjasmoro, Yellow biloxi, dan SP-10-4 (Tabel 5). Pada genotipe Tanggamus dan CG-22-10 media proliferasi 3% sukrosa + NAA 5 mg L⁻¹ + arginin 100 mg L⁻¹ + glutamin 100 mg L⁻¹ menghasilkan jumlah kulum KE tertinggi namun tidak berbeda nyata dengan media proliferasi 3% sukrosa + 2,4-D 5 mg L⁻¹ + NAA 5 mg L⁻¹ (Tabel 5). Pada percobaan ini hanya media proliferasi I8 yang menghasilkan proliferasi ES, dan genotipe Yellow biloxi memberikan jumlah ES hasil proliferasi tertinggi dibanding genotipe lainnya (Tabel 6).



Gambar 2. Berbagai embrio somatik (ES) lima genotipe kedelai yang dihasilkan, A) SP-10-4, B) Anjasmoro, C) Tanggamus, D) CG-22-10, dan E) Yellow biloxi

Media proliferasi yang digunakan pada percobaan ini adalah sama dengan media induksi yang digunakan pada percobaan 1a, tetapi merupakan lima media induksi terbaik berdasarkan diameter kalus dan jumlah sel embriogenik yang dihasilkan. Hal ini seperti dikemukakan oleh von Arnold *et al.* (2002) bahwa kalus embriogenik biasanya dipelihara dan mengalami proliferasi pada medium yang sama dengan yang digunakan pada media inisiasi, seperti juga yang digunakan pada kultur cair untuk propagasi skala besar. Proses proliferasi demikian dinamakan juga embriogenesis sekunder atau embriogenesis yang berulang (Moura *et al.*, 2009; Mongomake *et al.*, 2015).

Optimasi Induksi ES Lima Genotipe Kedelai

Jumlah embrio somatik yang dihasilkan pada percobaan induksi embrio somatik (percobaan 1) masih sangat sedikit dan hanya genotipe Yellow biloxi yang menghasilkan ketiga tahap embrio somatik (1 globular, 3 torpedo, dan 3 kotiledon), karena itu diperlukan percobaan optimasi media induksi ES untuk meningkatkan keberhasilan induksi ES dari eksplan kotiledon muda pada kelima genotipe yang diuji (Tanggamus, Anjasmoro, Yellow biloxi, SP-10-4, dan CG-22-10). Media yang digunakan pada percobaan ini merupakan tiga media induksi terbaik pada percobaan 1 yaitu media I7 (3% sukrosa + 2,4-D 10 mg L⁻¹ + NAA 10 mg L⁻¹), I8 (3% sukrosa + 2,4-D 5 mg L⁻¹ + NAA 5 mg L⁻¹), dan I9 (3% sukrosa + 2,4-D 40 mg L⁻¹). Hasil percobaan menunjukkan, media 3% sukrosa + 2,4-D 5 mg L⁻¹ + NAA 5 mg L⁻¹ merupakan media induksi terbaik dicirikan dengan perolehan jumlah ES (fase globular) yang tertinggi (Tabel

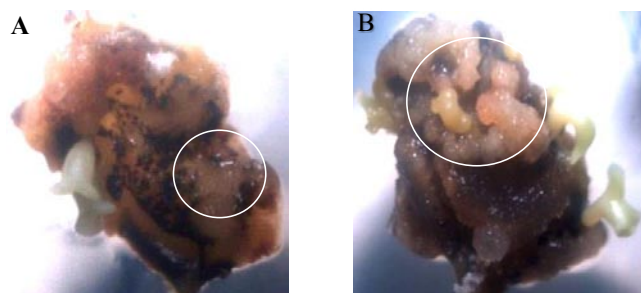
7). 2,4-D merupakan auksin terbaik untuk menginduksi pembentukan embrio somatik pada eksplan dibanding auksin lainnya seperti IAA, IBA, dan NAA (Pinheiro, 2013). Namun pada aplikasinya untuk induksi embriogenesis 2,4-D seringkali dikombinasikan dengan auksin lainnya antara lain dengan NAA seperti yang dilakukan (Mongomake *et al.*, 2015).

Genotipe Tanggamus memberikan jumlah ES (fase globular) tertinggi dibanding genotipe yang lainnya (Tabel 7). Berdasarkan fase-fase embrio yang terbentuk, genotipe Tanggamus juga menghasilkan keempat tahap embrio somatik (globular, hati, torpedo, dan kotiledon) yang kemudian disusul oleh genotipe Yellow biloxi. Perbedaan jumlah kalus embriogenik dan fase-fase embrio yang terbentuk antar genotipe diduga lebih disebabkan oleh faktor genotipe (*genotype-specific*) dari tanaman kedelai sehingga respon masing-masing genotipe pada tiap media memberikan hasil yang berbeda-beda.

Pengamatan histologi (metode parafin dengan pewarnaan *alcian blue*) dilakukan pada berbagai fase embrio somatik yaitu fase globular, fase hati, dan fase torpedo (Gambar 4). Fase globular terdiri dari sel-sel berukuran kecil dengan sitoplasma yang padat, terdapat inti yang besar. Fase ini merupakan permulaan diferensiasi struktural yang dimulai dengan pembentukan protoderm yang mengelilingi embrio somatik (Sharma and Millam, 2004).

Regenerasi ES Lima Genotipe Kedelai

Hasil regenerasi (*plant conversion*) semua embrio somatik (globular, hati, torpedo, dan kotiledon) pada percobaan 1 dan 2 menggunakan media MS0 (*free hormon*) dan media MS + sukrosa 10 g L⁻¹ + GA3 2 mg L⁻¹ + BAP 4 mg L⁻¹ + Vit B5 didapatkan ES genotipe Tanggamus yang berhasil berkecambah hingga membentuk struktur seperti tunas (inisiasi plantlet) (Gambar 5), yaitu : 7 ES dari media induksi 3% sukrosa + 2,4-D 10 mg L⁻¹ + NAA 10 mg L⁻¹ dan 8 ES dari media induksi 3% sukrosa + 2,4-D 40 mg L⁻¹. Embrio somatik genotipe Tanggamus diduga mengalami proses pematangan (*maturasi*) embrio yang lebih dewasa (*torpedo*, *cotyledonary*) dibanding keempat genotipe lainnya, hal ini seperti dibuktikan oleh fase-fase ES yang terbentuk dimana jumlah fase-fase ES (globular, hati, torpedo, dan kotiledon) genotipe Tanggamus lebih banyak dibanding genotipe lainnya yang diuji (Tabel 7). Embrio yang telah mencapai kematangan fisiologi



Gambar 3. Proliferasi ES pada genotipe Tanggamus. A) ES globular dan torpedo sebelum proliferasi, B) ES globular bertambah disertai terbentuknya kotiledon setelah proliferasi

biasanya memiliki kapasitas perkecambahan yang lebih baik, meskipun kemampuan konversi tanaman dari embrio somatik secara umum rendah. Embriogenesis somatik merupakan proses yang kompleks, kualitas hasil akhir yaitu

Tabel 5. Pengaruh media proliferasi terhadap jumlah kalus embriogenik pada masing-masing genotipe kedelai

Media proliferasi	Genotipe				
	Tanggamus	Anjasmoro	Yellow biloxi	CG-22-10	SP-10-4
3% suk + 2,4-D20 mg L ⁻¹ + asam amino2	20.9b	15.5b	16.1b	14.78cd	14.9b
3% suk + NAA5 mg L ⁻¹	21.4b	17.4b	16.7b	17.66bc	16.4b
3% suk + NAA5 mg L ⁻¹ + asam amino3	29.6a	24.2a	23.9a	22.02a	21.0a
3% suk + 2,4-D5 mg L ⁻¹ + NAA5 mg L ⁻¹	26.6a	24.6a	27.0a	19.81ab	22.4a
3 suk + 2,4-D20 mg L ⁻¹	19.4b	15.9b	15.2b	13.83d	14.1b

Keterangan: Angka-angka yang diikuti huruf kecil yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT ($\alpha = 0.05$). Seluruh media menggunakan media dasar MS, gelrite 2 g L⁻¹ dan mengandung vitamin B5. Suk = sukrosa; Asam amino1 = glisin 2 mg L⁻¹ + arginin 100 mg L⁻¹ + glutamin 100 mg L⁻¹; Asam amino2 = glisin 1 mg L⁻¹ + arginin 50 mg L⁻¹ + glutamin 50 mg L⁻¹; Asam amino3 = arginin 100 mg L⁻¹ + glutamin 100 mg L⁻¹

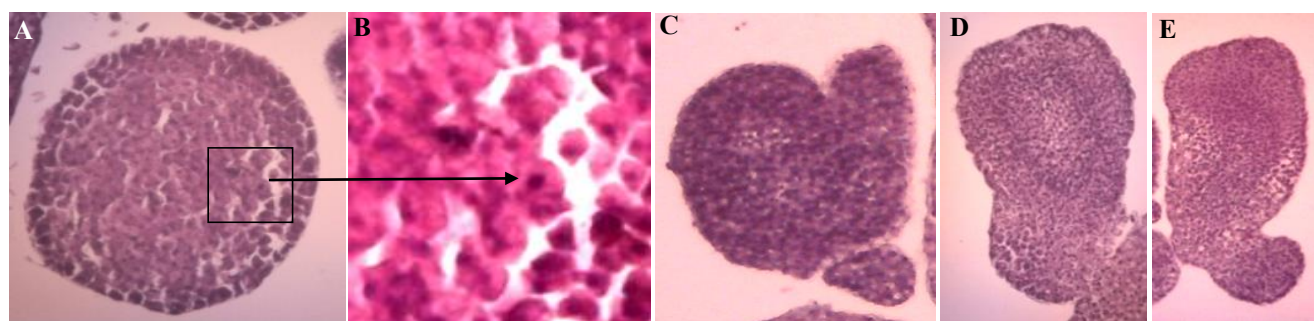
Tabel 6. Jumlah total ES lima genotipe kedelai setelah disubkultur dari media induksi I4 ke media proliferasi I8 pada 8 MSP

Genotipe	Jumlah globular awal	Jumlah total ES terbentuk setelah proliferasi			
		Globular	Hati	Torpedo	Kotiledon
Tanggamus	1	7	0	0	0
Anjasmoro	1	4	0	1	3
Yellow biloxi	2	9	0	0	0
CG-22-10	1	4	0	0	0
SP-10-4	2	6	0	0	0

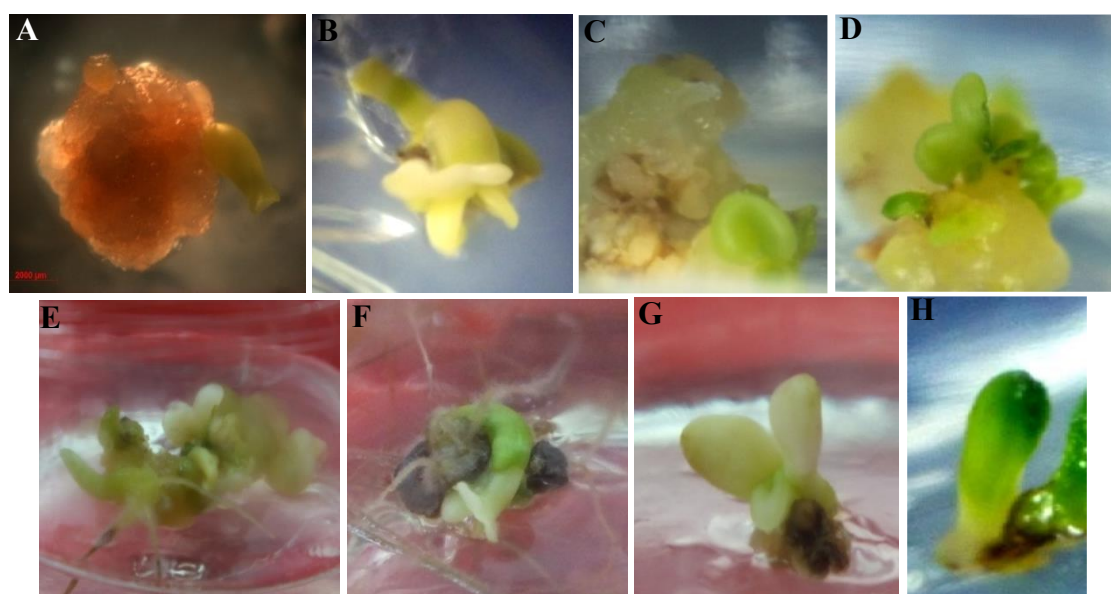
Tabel 7. Jumlah ES lima genotipe kedelai pada media induksi I7, I8, dan I9 pada 6 MSK

Genotipe	Media induksi	Jml eksplan yg diinokulasi	Jumlah embrio somatik			
			Globular	Hati	Torpedo	Kotiledon
Tanggamus	I7	20	16	0	2	3
	I8	20	29	0	3	0
	I9	20	24	2	5	3
Anjasmoro	I7	20	11	0	0	0
	I8	20	16	0	0	0
	I9	20	0	0	0	0
Yellow biloxi	I7	20	28	0	3	3
	I8	20	29	0	0	0
	I9	20	3	1	0	0
CG-22-10	I7	20	15	0	0	0
	I8	20	23	0	0	0
	I9	20	11	0	0	0
SP-10-4	I7	20	28	0	0	0
	I8	20	23	0	0	0
	I9	20	7	0	0	0

Keterangan: I7 = 3% Suk + 2,4-D 10 mg L⁻¹ + NAA 10 mg L⁻¹; I8 = 3% Suk + 2,4-D 5 mg L⁻¹ + NAA 5 mg L⁻¹; I9 = 3% Suk + 2,4-D 40 mg L⁻¹. Seluruh media menggunakan media dasar MS, gelrite 2 g L⁻¹ dan mengandung vitamin B5. Eksplan = klum kalus



Gambar 4. Tahapan embriogenesis somatik pada genotipe Yellow biloxi: (A) Fase globular, (B) sel-sel embrio globular dicirikan dengan sel-sel berukuran kecil dan inti (nukleus) yang besar, (C) Fase hati, (D) Fase torpedo, dan (E) bakal kotiledon



Gambar 5. Regenerasi ES genotipe Tanggamus pada media MS0 (A, B, C, dan D) dan sesudah disubkultur dari media MS0 ke media MS+2 ppm GA3+4 ppm BAP (E, F, G dan H)

pertumbuhan dan daya hidup tanaman akan bergantung pada kondisi sebelumnya seperti ketika terjadi pematangan embrio dan berkecambah, hanya embrio matang dengan morfologi normal, nutrisi yang cukup, dan toleran desikasi yang akan berkembang menjadi tanaman normal (Afreen and Zobayed, 2005). Keberhasilan regenerasi tanaman dari embrio somatik juga sangat tergantung pada genotipe yang digunakan. Kedelai, dan kapas merupakan tanaman yang paling sulit diregenerasikan secara *in vitro* dibandingkan semua jenis tanaman budidaya utama lainnya (Rao *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2008). Hasil penelitian ini memberi harapan keberhasilan regenerasi kedelai secara *in vitro*.

KESIMPULAN

Responsivitas eksplan terhadap pembentukan kalus embriogenik dipengaruhi oleh interaksi antara genotipe kedelai dan media induksi yang digunakan. Induksi KE tertinggi didapatkan pada genotipe Anjasmoro yang dikulturkan pada media induksi MS + 5 ppm 2,4-D + 5

ppm NAA. Media MS + 5 ppm 2,4-D + 5 ppm NAA juga merupakan media proliferasi KE terbaik pada masing-masing genotipe (Tanggamus, Anjasmoro, Yellow biloxi, SP-10-4, dan CG-22-10) dan genotipe Yellow Biloxi menghasilkan jumlah ES tertinggi hasil proliferasi. Genotipe Tanggamus memberikan optimasi induksi ES tertinggi dengan jumlah ES fase globular terbanyak, dan menghasilkan keempat tahap embrio somatik yang terbentuk yaitu globular, hati, torpedo, dan kotiledon disamping genotipe Yellow biloxi. Genotipe Tanggamus berhasil membentuk kecambah dan membentuk plantlet pada media induksi MS + 2,4-D 40 ppm dan media MS + 10 ppm 2,4-D + 10 ppm NAA.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis ucapkan kepada I-MHERE Project (DGHE) B2.C yang telah membiayai penelitian ini. Terima kasih juga disampaikan kepada Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, IPB, atas fasilitas penelitian yang telah diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Afreen, F., S.M.A. Zobayed. 2005. Photoautotrophic Plant Conversion in the Process of Somatic Embryogenesis. Springer, Netherlands.
- [BPS] Badan Pusat Statistik. 2014. Luas Panen, Produktivitas, dan Produksi Kedelai. <http://www.bps.go.id> [21 Februari 2014].
- Bairu, M.W., A.O. Aremu, J.V. Staden. 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regul.* 63:147-173.
- Cangahuala-Inocente, G.C., L.L.D Vesco, D. Steinmacher, A. C. Torres, M. P. Guerra. 2007. Improvements in somatic embryogenesis protocol in Feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burret): Induction, conversion and synthetic seeds. *Sci. Hort.* 111:228-234.
- Ducos, J.P., G. Labbe, C. Lambot, V. Pe'tiard. 2007. Pilot scale process for the production of pregerminated somatic embryos of selected robusta (*Coffea canephora*) clones. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 43:652-659.
- Feitosa, T., J.L.P. Bastos, L.F.A. Ponte, T.L. Jucá, F.A.P. Campos. 2007. Somatic embryogenesis in cassava genotypes from the Northeast of Brazil. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 50:201-206.
- Hiraga, S., H. Minakawa, K. Takahashi, R. Takahashi, M. Hajika, K. Harad, N. Ohtsubo. 2007. Evaluation of somatic embryogenesis from immature cotyledons of Japanese soybean cultivars. *Plant Biotechnol.* 24:435-440.
- Hussein, S., R. Ibrahim, A.L.P Kiong. 2006. Somatic embryogenesis: an alternative method for *in vitro* micropropagation. *Iran J. Biotech.* 4:156-161.
- Jalil, M., W.W. Chee, R.Y. Othman, N. Khalid. 2008. Morphohistological examination on somatic embryogenesis of *Musa acuminata* cv. Mas (AA). *Sci. Hort.* 117:335-340.
- Mongomake K., O. DOUNGOS, B. Khatabi, V. N. Fondong. 2015. Somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) landraces from Cameroon. *SpringerPlus* 4:477.
- Karami, O., A. Deljou, M. Esna-Ashari, P. Ostad-Ahmadi. 2006. Effect of sucrose concentrations on somatic embryogenesis in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Sci. Hort.* 110:340-344.
- Khasim, S.M. 2002. Botanical Microtechnique: Principles and Practice. Capital Publishing Company. New Delhi.
- Kumari, B.D.R., A. Settu, G. Sujatha. 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration. *IJBT.* 5:243-345.
- Lestari, E.G. 2006. Review: *In vitro* selection and somaclonal variation for biotic and abiotic stress tolerance. *Biodiversitas* 7:297-301.
- Lin, J.C., Z.X. Long, J.S. Xia, Y.X. Yan, Z.H. Guo, F.L. Li. 2008. An efficient culture system for synchronization control of somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Acta Agron. Sin.* 34:224-231.
- Loganathan, M., S. Maruthasalam, Y.S. Ling, C.L. Wei, H.H. Wen, F.L. Pei, W.Y. Chih, H.L. Chin. 2010. Regeneration of soybean (*Glycine max* L. Merrill) through direct somatic embryogenesis from the immature embryonic shoot tip. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 46:265-273.
- Mohanty, S., M. Panda, E. Subudhi, S. Nayak. 2008. Plant regeneration from callus culture of *Curcuma aromatica* and *in vitro* detection of somaclonal variation through cytophotometric analysis. *Biol. Plantarum* 52:783-786.
- Moura, E.F., S.Y. Motoike, M.C. Ventrella, A.Q. de Sa' Junior, M. Carvalho. 2009. Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. *Sci. Hort.* 119:447-454.
- Orbovic, V., M. Calovic, Z. Vioria, B. Nielsen, F. Gmitter, W. Castle, J. Grosser. 2008. Analysis of genetic variability in various tissue culture-derived lemon plant populations using RAPD and flow cytometry. *Euphytica* 161:329-335.
- Pinheiro, M.V.M., F.B. Martins, A.C.F. da Cruz, A.C.P.P. de Carvalho, M.C. Ventrella, W.C. Otoni. 2013. Maturation of *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel somatic embryos from nodal segments. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 49:304-312.
- Rao, A.Q., S.S. Hussain, M.S. Shahzad, S.Y.A. Bokhari, M.H. Raza, A. Rakha, A. Majeed, A.A. Shahid, Z. Saleem, T. Husnain, and S. Riazuddin. 2006. Somatic embryogenesis in wild relatives of cotton (*Gossypium spp.*). *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 7:291-298.

- Rossin, C.B., M.E.C. Rey. 2011. Effect of explant source and auxins on somatic embryogenesis of selected cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars. S. Afr. J. Bot. 77:59-65.
- Saelim, L., S. Phansiri, S. Netrphan, M. Suksangpanomrung, J. Narangajavana. 2006. Optimization of *in vitro* cyclic somatic embryogenesis and regeneration of the Asian cultivars of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) for genetic manipulation system. Glob. J. Biochem. Biotechnol. 1:7-15.
- Sharma, S.K., S. Millam. 2004. Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L.: histological examination of key developmental stages. Plant Cell Rep. 23:115-119.
- Suharsono, M. Jusuf. 2009. Analisis generasi F2 dan seleksi pertama dari persilangan kedelai antara kultivar Slamet dan Wase. J. Agron. Indonesia 37:21-27.
- Texeira, L.R., A.L. Braccini, B.G.M. Churata, E.S.N. Vieira, P.K. Martins, I. Schuster. 2011. Evaluation of soybean cultivars on the embryogenic and organogenic potential. Acta Sci. Agron. 33:67-74.
- Thiruvengadam, M., S.V. Mohamed, C.H. Yang, N. Jayabalan. 2006. Development of an embryogenic suspension culture of bitter melon (*Momordica charantia* L.). Sci. Hort. 109:123-129.
- Ugandhar, T., M. Venkateshwarlu, D. Parvathi, G.P.V. Shekar, T. Srilatha, K.J. Reddy. 2011. High frequency somatic embryogenesis and plantlet regeneration from shoot tip explants of soybean. Sci. Res. Rept. 1:146-150.
- von Arnold, S., I. Sabala, P. Bozhkov, J. Dyachok, L. Filonova. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 69:233-249.
- Yang, C., T. Zhao, D. Yu, J. Gai. 2009. Somatic embryogenesis and plant regeneration in Chinese soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]-impacts of mannitol, abscisic acid, and explant age. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 45:180-188.